

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS
Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia



GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS DE LABORATORIO

QUÍMICA BIOLÓGICA

Carreras: **Profesorado en Biología**
 (Plan 10/00)
 Licenciatura en Cs. Biológicas
 (Plan 08/13)

Equipo Docente

Prof. Responsables: Alicia Molina - Ana Cecilia Anzulovich
JTP: Rebeca Golini- Yamila Carmona

Auxiliar: Daniela Pardo

2018

La presente Guía de Trabajos Prácticos pertenece al curso de Química Biológica, del segundo año de las carreras de Licenciatura en Ciencias Biológicas y Profesorado de Biología.

Este curso obligatorio corresponde al ciclo básico, posee un crédito horario de 8 hs semanales (3 h de clases teóricas, 2 h de Trabajos Prácticos de Aula y 3 h de Trabajos Prácticos de Laboratorio), y un total de 110 h, que se dictan en el primer cuatrimestre del año.

Para las carreras de Licenciatura en Ciencias Biológicas y de Profesorado en Biología, para el cursado de Química Biológica, de acuerdo a lo estipulado en los planes 010/00 (Profesorado de Biología) y 08/13 (Lic en Cs Biológicas), es necesario tener aprobados los cursos de Biología General y Química General e Inorgánica y regularizado el curso de Química Orgánica. Para rendir el curso de Química Biológica se requiere tener aprobado el curso de Química Orgánica.

Esta Guía de Trabajos Prácticos consta de los Trabajos Prácticos de Laboratorio.

Durante el desarrollo del curso el alumno adquirirá conocimientos sobre:

1.-Enzimas: el alumno aprenderá sobre las propiedades generales, las características cinéticas y los mecanismos de regulación de las enzimas.

2.- Los procesos de obtención de energía metabólica y su utilización en los distintos procesos biológicos.

3.-El metabolismo celular. Se estudiarán las vías metabólicas de degradación y de biosíntesis, las reacciones enzimáticas fundamentales y sus mecanismos de regulación.

Los docentes encargados del dictado de este curso son: Dra. Alicia Molina (Profesora Responsable del dictado para la carrera de Licenciatura en Ciencias Biológicas y Profesora Colaboradora del dictado para la carrera de Profesorado en Biología), Dra. Ana Cecilia Anzulovich (Profesora Responsable del dictado para la carrera de Profesorado en Biología y Profesora Colaboradora del dictado para la carrera de Licenciatura en Ciencias Biológicas), Dra. Yamila Carmona y Dra. Rebeca Golini (Jefes de Trabajos Prácticos) y Daniela Pardo (Auxiliar).

ÍNDICE

TRABAJOS PRÁCTICOS DE LABORATORIO

NORMAS DE BIOSEGURIDAD.	4
T. P. DE LABORATORIO N° 1: INTRODUCCIÓN AL MANEJO DE INSTRUMENTAL Y MATERIAL DE LABORATORIO. PRINCIPIOS DE ABSORCIOMETRÍA ESPECTROFOTOMÉTRICA. APLICACIÓN: CURVA DE CALIBRACIÓN DE GLUCOSA.	7
T.P. DE LABORATORIO N° 2: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA. FACTORES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS.	18
T.P. DE LABORATORIO N° 3: TRANSPORTE ELECTRÓNICO MITOCONDRIAL FOSFORILACIÓN OXIDATIVA.	26
T.P. DE LABORATORIO N° 4: EVIDENCIA DEL TRANSPORTE ELECTRÓNICO FOTOINDUCIDO EN CLOROPLASTOS.	30
T.P. DE LABORATORIO N° 5: METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO. EFECTO PASTEUR- DEMOSTRACIÓN DE LA FERMENTACIÓN ANAERÓBICA EN LEVADURAS.	34
BIBLIOGRAFÍA.	41

NORMAS DE BIOSEGURIDAD

Riesgo Biológico y Químico

La manipulación o exposición a agentes biológicos y químicos puede traer como consecuencia la infección del personal expuesto, con o sin manifestación de enfermedad. En humanos, el riesgo de infección es el más significativo (por la frecuencia e importancia) y el más antiguo de los reconocidos por los profesionales de la salud. Entre las causas atribuidas a las infecciones del personal de laboratorio se destacan: el uso de objetos punzo-cortantes contaminados con fluidos corporales, los derrames o salpicaduras, el trabajo con animales de laboratorio, no tomar las adecuadas medidas de protección, etc.

Reglas críticas de higiene y seguridad

Al formarse como profesional en Ciencias Biológicas, debe tener en cuenta una serie de normas, que contribuirán a llegar a resultados exactos, a un correcto desempeño en las actividades a desarrollar en un laboratorio y al cuidado de su salud.

NORMAS DE BIOSEGURIDAD QUE EL ALUMNO DEBERA CUMPLIR PARA TRABAJAR EN EL LABORATORIO

*Las normas de seguridad indicadas a continuación, están hechas para la protección de su vida, por lo tanto su cumplimiento es **OBLIGATORIO**.*

A saber:

- 1) Los pasillos de circulación, vías de evacuación y puertas de emergencia del laboratorio deben ser de libre circulación y no estar obstruidas.
- 2) El uso del guardapolvo y guantes de látex es obligatorio dentro del laboratorio. El uso de barbijo y lentes es obligatorio en el trabajo práctico que lo requiera.
- 3) No se permitirá la entrada a los laboratorios con pantalones cortos, calzado descubierto o cabello largo suelto.
- 4) Está terminantemente prohibido fumar, comer, e ingerir bebidas en el laboratorio.
- 5) Deberá mantener su mesada y piletas limpias. Para ello a cada trabajo práctico debe traer una rejilla o repasador limpio.
- 6) Al comenzar el trabajo práctico, todo el material debe estar limpio y seco para evitar inexactitudes.

- 7) No malgaste los reactivos. No los impurifique con pipetas sucias, esto perjudicará su trabajo y el de sus compañeros. Nunca devuelva al recipiente original una sustancia que se ha sacado del mismo, pues podría contaminarla.
- 8) Cuando trabaje con material biológico (sangre total, suero, orina) utilice guantes, considérela material infecto-contagioso, por lo tanto use los elementos de protección individuales adecuados.
- 9) Los *tips* de micropipetas y pipetas de vidrio, luego de ser utilizados, deberán ser descartados dentro de los correspondientes recipientes con lavandina, para una descontaminación previa al lavado final. No los deje apoyados sobre la mesada.
- 10) No deberá pipetear ácidos, álcalis, o cualquier producto corrosivo o tóxico, con la boca, use una pera de goma o propipeta. Si algún reactivo es accidentalmente ingerido, avise de inmediato al personal docente.
- 11) Si algún líquido corrosivo toca su cuerpo, use la ducha y lave la zona afectada con abundante agua, si los afectados son los ojos use el lavaojos y lávelos durante 15 minutos luego solicite primeros auxilios.
- 12) Todas las operaciones que impliquen el desprendimiento de gases tóxicos y/o irritantes deberán efectuarse bajo la campana extractora.
- 13) En caso de derrame de ácidos ó solventes se procederá a volcar sobre el mismo un balde de arena destinado a tal fin.
- 14) Dilución de ácidos: Cuando realice la dilución de un ácido proceda a añadir lentamente el ácido al agua contenida en un vaso, agitando constantemente y enfriando el vaso receptor. Nunca añadir agua al ácido (recuerde: “*no se debe darle de beber al ácido*”).
- 15) Uso y Tratamiento de reactivos y soluciones químicas:
 - a- Al usar cualquier tipo de reactivos, asegúrese que es el correcto y lea bien su etiqueta. Si es transferido a otro recipiente, rotúlelo de nuevo.
 - b- Todos los reactivos deberán manipularse con el material perfectamente limpio. Todos los sólidos deberán manejarse con espátula.
 - c- No utilizar reactivos sin haber registrado sus propiedades en el cuaderno de laboratorio, enterándose de los riesgos de su uso y tomando las precauciones pertinentes.
 - d- No manipular productos inflamables (benceno, tolueno, éter, etc.) en presencia de mecheros encendidos.
 - e- Cuando un reactivo requiera una agitación vigorosa por inversión del recipiente, tápelo con un tapón de vidrio esmerilado o de goma, nunca lo haga con la mano.
 - f- Al calentar una solución y/o reactivo, hágalo en recipientes adecuados para ese efecto.
 - g- Al calentar una solución en un tubo de ensayo debe hacerse bajo el nivel del líquido y agitando constantemente. No apuntar el tubo hacia compañero o a sí mismo, pues puede proyectarse.
 - h- Cualquier material caliente debe colocarse sobre una placa resistente al calor.

i-Algunos desperdicios líquidos podrán desecharse en las piletas de descarga con un rango pH moderado de 6-8, dejando correr suficiente agua, ya que muchos de ellos pueden ser corrosivos. Soluciones alejadas de estos pH deberán primero ser neutralizadas antes de desecharlas.

16) Todos los desperdicios sólidos y papeles, no patológicos o contaminantes, deberán colocarse en los botes de basura. Los residuos sólidos patológicos o contaminantes deberán desecharse en los recipientes con bolsas rojas destinados a tal fin. El material de vidrio roto deberá descartarse en recipientes especiales para ese efecto.

17) Con respecto al Trabajo Práctico: Luego de finalizado el trabajo práctico, lave el material, enjuáguelo con agua destilada y déjelo secar.

18) Controle que todo el instrumental que utilizó (espectrofotómetro, centrifugas, peachímetro, etc.) quede limpio, apagado y cubierto con su funda si fuera necesario.

19) Las bromas en su trabajo pueden causar accidentes, no las haga, trabaje con seriedad pensando que está próximo a desempeñarse como profesional. En el laboratorio, no corra, camine.

T. P. DE LABORATORIO N° 1

INTRODUCCIÓN AL MANEJO DE INSTRUMENTAL Y MATERIAL DE LABORATORIO PRINCIPIOS DE ABSORCIOMETRÍA ESPECTROFOTOMÉTRICA APLICACIÓN: CURVA DE CALIBRACIÓN DE GLUCOSA

OBJETIVOS

- Adquirir destreza en el uso del material e instrumental del laboratorio.
- Conocer los principios que rigen la absorciometría espectrofotométrica.
- Realizar una curva de calibración de azúcares reductores (glucosa) que se utilizará en el trabajo práctico N° 2.
- Comprender el fundamento de la utilización de curvas de calibración para obtener el valor de concentración de una sustancia en solución.

INTRODUCCIÓN

Espectrofotometría - Ley de Lambert y Beer

Los principios de la Absorciometría espectrofotométrica son frecuentemente utilizados en el laboratorio biológico para la cuantificación e identificación de reacciones químicas y enzimáticas.

Los métodos absorciométricos permiten determinar la fracción de radiación absorbida por un componente en estudio. Estos son métodos ópticos basados en la absorción o emisión de energía radiante.

La espectrofotometría de Absorción se puede realizar en la zona ultravioleta (región UV: 200-400 nm de longitud de onda) y en la zona visible (región visible: 400-800 nm) del espectro electromagnético, usando equipos llamados espectrofotómetros y fotocolorímetros.

Si la luz blanca atraviesa una solución que contiene una sustancia coloreada, ciertas longitudes de onda (λ) son selectivamente absorbidas y el color resultante se debe a la luz transmitida. Cada sustancia tiene un espectro de absorción característico que permite identificarla.

Si la luz incidente de una determinada longitud de onda es absorbida por una sustancia, la cantidad de luz absorbida por la misma permite cuantificarla.

Cuando sobre una celda –o cubeta- de paredes planas y paralelas que contienen una solución transparente, sin material en suspensión, incide en forma perpendicular un haz de rayos paralelos de luz monocromática (de longitud de onda específico) la energía de la luz incidente se distribuye principalmente en dos:

- a) la energía absorbida por la solución

- b) la energía transmitida, que es lo percibido por el ojo humano o detector del espectrofotómetro y cuya intensidad a una determinada longitud de onda, está vinculada a la “concentración de la especie absorbente” y a la “longitud del camino óptico”.

Estas observaciones fueron generalizadas en la **Ley de Lambert y la de Beer**, que rigen la Espectrofotometría.

Lambert estableció que la cantidad de luz absorbida, a una determinada longitud de onda, depende del espesor del medio absorbente (longitud del camino óptico).

Beer generalizó que la intensidad de la luz absorbida es directamente proporcional al logaritmo de la concentración del componente en solución.

La Ley de Beer expresa lo mismo que la de Lambert pero con respecto a la concentración del componente interpuesto en el camino del haz.

Si se consideran ambas variables, longitud del camino óptico y concentración de la especie absorbente, en forma simultánea se tiene:

$$I = I_0 \cdot e^{-k'' l c} \quad (1)$$

I: intensidad de la luz transmitida

I_0 : intensidad de la luz incidente

l: longitud del camino óptico (espesor de la cubeta, constante)

c: concentración de la especie absorbente (moles/ litro)

k'' : constante

En otra forma:

$$I = I_0 \cdot 10^{-a l c} \quad (2)$$

Ley de Lambert - Beer

a: Absortividad = $k'' / 2,303$

Definiendo **Transmitancia (T)** como:

$$T = I / I_0$$

y reemplazando en (2) se obtiene:

$$I / I_0 = T = 10^{-a l c} \quad (3)$$

La **absorbancia** (**A**) (en el pasado llamada Densidad Óptica) se define como:

$$A = -\log T \text{ ó } A = \log 1/T \quad (4)$$

Tomando log en (3) y multiplicando ambos miembros por -1 se obtiene:

$$A = a \cdot l \cdot c$$

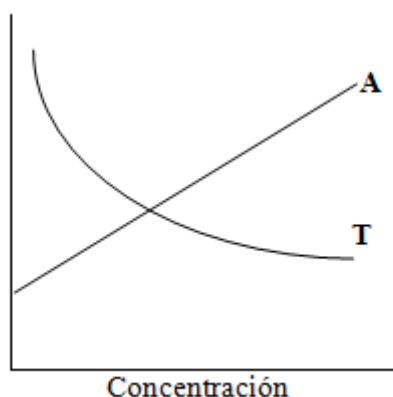
Como las cubetas que se utilizan están calibradas en ancho constante, entonces entre la absorbancia y concentración existe una relación lineal.

Cuando c está expresada en mol/l y l en cm, a expresa la absortividad molar o **Coefficiente de Absorción molar** (ϵ) (en unidades litros / mol x cm).

Entonces la **Ley de Lambert y Beer** se puede escribir también:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

En Absorciometría se puede utilizar la expresión de transmitancia (T), pero es más útil la absorbancia (A), debido a su dependencia lineal con la concentración y la longitud del camino óptico, como lo muestra el siguiente gráfico.

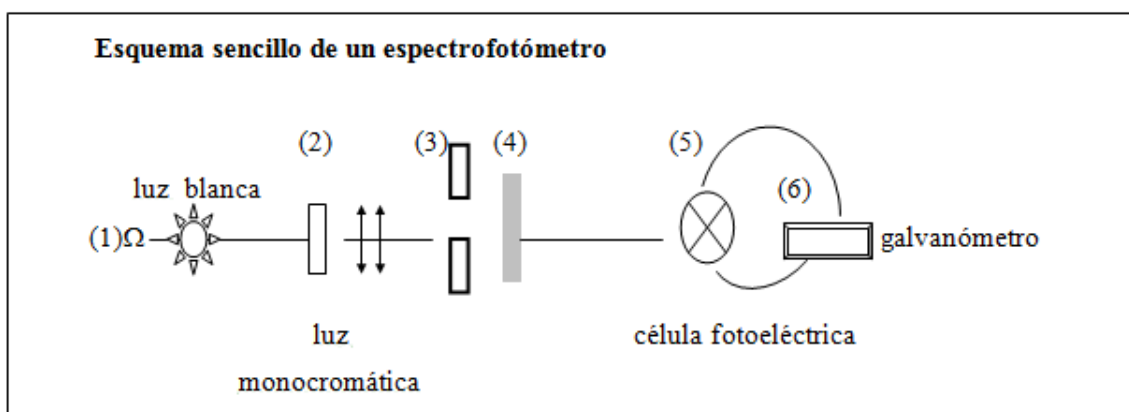


La Ley de Lambert es exacta y aplicable a cualquier medio absorbente (gas, líquido, solución), pero la de Beer tiene excepciones (alteración en los instrumentos, factores químicos implicados en la reacción y otros errores).

Las medidas se realizan habitualmente con un **espectrofotómetro**, cuyos componentes principales son:

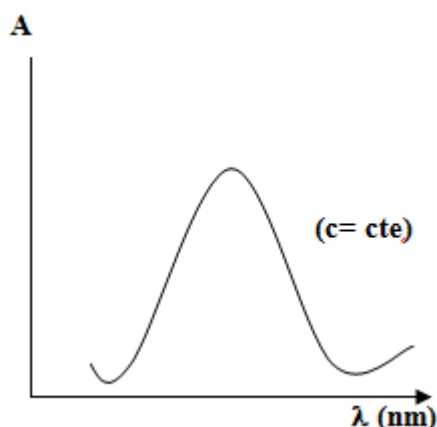
1. Fuente de radiación: lámpara de W, H₂ o Deuterio.
2. Control de longitud de onda: prisma o red de difracción.
3. Ranura ajustable.
4. Receptáculo para la solución muestra: cubeta de vidrio, cuarzo o plástico.
5. Fotodetector: célula fotoeléctrica.
6. Instrumento de medida: galvanómetro o potenciómetro.

La celda o cubeta debe tomarse por sus caras opacas y colocarla de forma que la radiación incida sobre las caras pulidas.

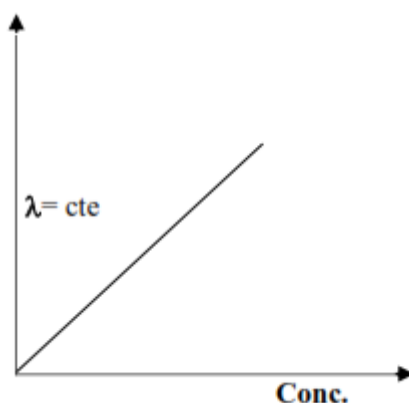


Medidas espectrofotométricas

1. La Absorbancia (A) de una solución de la sustancia a determinar se lee a una concentración tal que dicha absorbancia caiga entre 0,3 y 0,7 unidades.
2. Con la misma solución se realiza una Curva Espectral a una concentración constante. Se mide la Absorbancia variando la λ . A partir de esta curva se selecciona la λ máxima, para usarla como λ de trabajo.



3. Se preparan una serie de soluciones patrón del componente a determinar, de concentración creciente y perfectamente conocida, en el rango de 0.100 y 0.700 unidades de Absorbancia.
4. Si es necesario se realiza una reacción de color con un reactivo cromogénico adecuado, tanto en las soluciones patrones como en la muestra.
5. Se lee la Absorbancia de los patrones a la λ seleccionada (a partir de la Curva Espectral), manteniéndola constante. La gráfica Absorbancia (A) versus Concentración (C) permite verificar la Ley de Beer y calcular el valor de ϵ . La representación gráfica de la misma se la denomina **curva de calibración**.



6. La Absorbancia de la muestra desconocida se mide a la misma λ y se determina su concentración usando el valor de ϵ calculado o interpolando en la curva de calibración.
7. Las medidas espectrofotométricas se realizan tomando como referencia una solución **Blanco** que contiene todos los reactivos menos la muestra y fue tratado en condiciones experimentales idénticas a la muestra. La **Curva de Calibración** permite así el cálculo de la concentración del componente, que absorbe a esa λ .

Hay que advertir que una respuesta lineal no se obtiene en todo el rango de concentraciones posibles sino dentro de un conjunto de valores que dependen de numerosos factores dependientes del método de medición, **en general se aceptan valores de Absorbancia menores a uno.**

APLICACIÓN DE MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS:

ELABORACIÓN DE UNA CURVA DE CALIBRACIÓN

Una curva de calibración permite el cálculo de la concentración desconocida de un soluto en solución que absorbe a una determinada longitud de onda.

CURVA DE CALIBRACIÓN DE GLUCOSA

- Distintas soluciones de glucosa de concentraciones conocidas se someterán a la reacción colorimétrica de Nelson y Somogyi, para determinación de azúcares reductores como la glucosa.
- A cada solución de glucosa se le leerá la Absorbancia a una λ de 620 nm en el espectrofotómetro.
- Esos datos serán utilizados para graficar Absorbancia versus Concentración.
- La Curva de Calibración resultante, se aplicará en el T.P. N° 2 de Enzimas, para calcular la concentración desconocida de azúcares reductores.

MÉTODO COLORIMÉTRICO DE NELSON Y SOMOGYI

Determinación de azúcares reductores

Reactivos (Curva de calibración)

Glucosa 0.003 M

NaOH 0.6 N

SO₄Zn 0.6 N

Reactivo cromogénico de Nelson-Somogyi (Ver preparación a continuación).

Reactivo cromogénico de Nelson-Somogyi:

I) Reactivo Cuprotartárico:

Solución A: Sulfato de cobre al 2 %

Sulfato de sodio anhidro al 3 %

Solución B: Carbonato de sodio anhidro a 3 %

Bicarbonato de sodio al 2%

Tartrato de sodio y potasio al 1.5 %

Sulfato de sodio anhidro al 12 %

En el momento de usar, mezclar 1 volumen de A y 4 volúmenes de B.

II) Reactivo Arsenomolibdico:

Solución A: Molibdato de amonio 25 g
 Acido sulfúrico conc. 21 ml
 H₂O destilada 450 ml

Solución B: Arseniato disódico 7H₂O 3 g
 H₂O destilada 25 ml

Mezclar y mantener a 37 °C durante 24 hs. Guardar en frasco color caramelo.

Fundamento del método

Sobre una alícuota de solución de glucosa se adiciona el reactivo cuprotartárico, de alcalinidad moderada y se mezcla rotando suavemente. Calentar en baño maría hirviendo durante 10 min. Enfriar bajo agua corriente sin agitación violenta para evitar la reoxidación del Cu₂O por el oxígeno del aire. En frío se agrega el reactivo arsenomolibdico, que en medio ácido se reduce y forma óxidos de molibdeno de menor valencia, color verde azulado, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de azúcares reductores presentes. Se lee en espectrofotómetro a 620 nm entre los 15 y 30 minutos después de agregado el reactivo final.

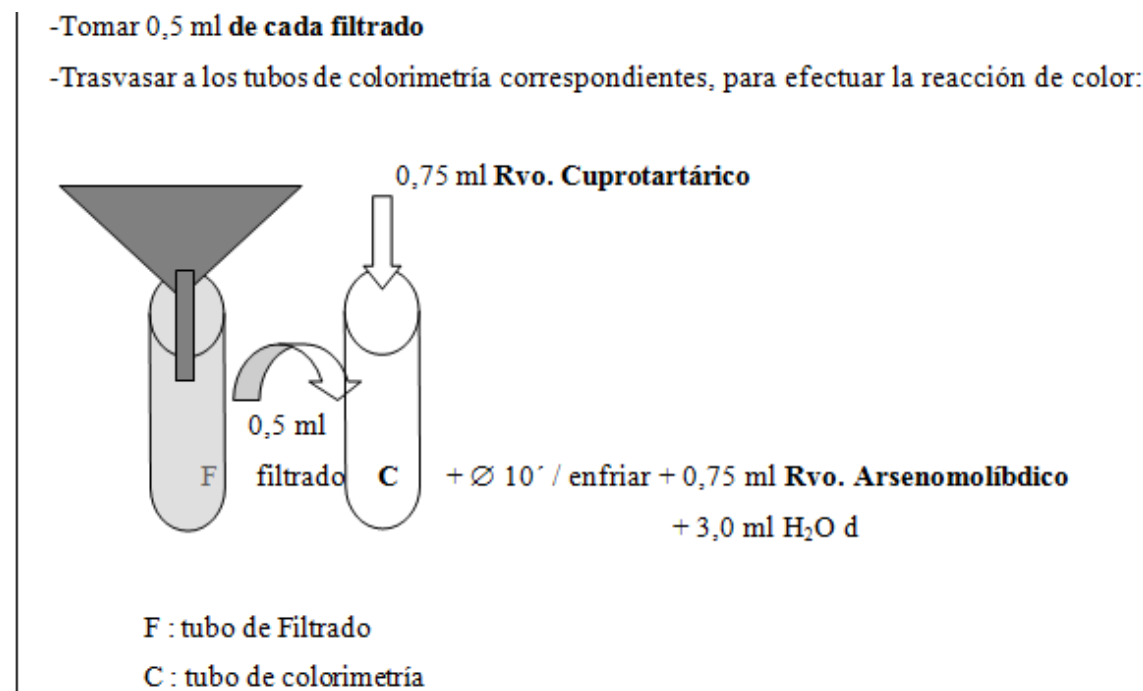
Previo al Trabajo Práctico N° 2, donde se estudiará la actividad de la enzima *invertasa* (que degrada la sacarosa produciendo glucosa) se debe realizar una Curva de Calibración para glucosa. Esta Curva de Calibración permitirá relacionar la concentración de un azúcar reductor como glucosa, con la intensidad de color o Absorbancia del producto formado. Para ello se trabaja con cantidades conocidas y crecientes de glucosa, procediendo de igual manera que si se tratara de la reacción enzimática a realizar en el TP N°2, para igualar condiciones experimentales. Con los datos obtenidos se grafica absorbancia en relación con la concentración de glucosa, obteniéndose una recta que pasa por el origen.

Cuando por el efecto de la enzima *invertasa* sobre sacarosa, se produce una cantidad desconocida de azúcares reductores, ésta puede calcularse por medio de la Curva de Calibración.

TÉCNICA: Preparar la siguiente serie de tubos y agregar los reactivos que se indican a continuación:

Tubos N°	1 (Blanco)	2	3	4	5	6
NaOH 0.6 N (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Glucosa 0.003 M (ml)	-	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Zn SO ₄ 0.6 N (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
H ₂ O d. (ml)	8.0	7.8	7.6	7.4	7.2	7.0
<p style="text-align: center;">Mezclar bien y filtrar</p> <p style="text-align: center;">Recibir el filtrado en los tubos (F), cuyo subíndice debe corresponder al número de tubo del que proviene la mezcla</p>						
Tubos de filtrado	F-1	F-2	F-3	F-4	F-5	F-6
<p style="text-align: center;">Trasvasar a los tubos de colorimetría (C) correspondientes, para efectuar la reacción de color de Nelson- Somogyi</p>						
Tubos de colorimetría	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Filtrado (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Rvo.Cuprotartárico	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
<p style="text-align: center;">Mezclar suavemente</p> <p style="text-align: center;">Colocar en baño maría hirviendo durante 10 min.</p> <p style="text-align: center;">Enfriar con agua corriente y agregar en ml:</p>						
Rvo. Arsenomolibdico	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
H ₂ O d.	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
<p style="text-align: center;">Usando guantes de látex invertir los tubos tapándolos con el pulgar</p> <p style="text-align: center;">Eliminar las burbujas cuidadosamente</p> <p style="text-align: center;">Leer la Absorbancia en espectrofotómetro a 620 nm</p> <p style="text-align: center;">Utilizar como Blanco el tubo N° 1.</p>						

Esquema resumido de la técnica de filtrado y reacción de color:



RESULTADOS:

Tubo N°	1(Blanco)	2	3	4	5	6
Lectura de Absorbancia (a 620 nm)						
Absorbancia corregida						
Glucosa (µmoles)	0	0,6	1,2	1,8	2,4	3,0

- Corregir la lectura de Absorbancia de cada tubo restándole la Absorbancia del Blanco.
- Graficar las lecturas corregidas de la Absorbancia versus los µmoles de glucosa.
- Interpretar la Curva de Calibración obtenida.

Cálculo de la concentración final de glucosa (µmoles) en cada tubo:

Ejemplo Tubo N°2: contiene 0.2 ml de Glucosa 0.003 M

Peso Molecular Glucosa: 180 g/mol

Glucosa 1M ----- 1000 ml -----180 g /mol

Glucosa 0.003 M ----- 1000 ml ----- x= 0.540 g /mol

1000 ml ----- 0.540 g

0.2 ml ----- $x = 1.08 \times 10^{-4}$ g

(PM Glucosa) 180 g ----- 1 mol de Glucosa

1.08×10^{-4} g ----- $x = 0.6 \times 10^{-6}$ mol

$x = 0.6 \mu\text{mol}$ Glucosa

CONTENIDOS CLAVE A SER EVALUADOS

-BIOSEGURIDAD Y MANEJO DE INSTRUMENTAL DE LABORATORIO

Normas de bioseguridad que el alumno deberá cumplir para trabajar en el laboratorio.

Aplicación de normas de seguridad en situaciones de emergencia.

Cuidados a tener en el manejo de muestras biológicas.

-MANEJO DE INSTRUMENTAL - ESPECTROFOTOMETRÍA

Conceptos de absorciometría espectrofotométrica. Ley de Lambert- Beer.

Espectrofotómetro. Medidas espectrofotométricas.

Aplicación con la realización de una Curva de Calibración para concentraciones conocidas de glucosa por el método colorimétrico de Nelson- Somogyi. Fundamento, importancia, utilidad.

T.P. DE LABORATORIO N° 2

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA. FACTORES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS

OBJETIVOS

- Determinar la actividad enzimática de la *invertasa*.
- Utilizar la curva de calibración realizada en el trabajo práctico anterior, para el cálculo de resultados de velocidad de reacción.
- Interpretar las modificaciones de la actividad enzimática con distintos factores (pH y concentración de sustrato).
- Determinar gráficamente el valor de K_m .

INTRODUCCIÓN

La cantidad de una enzima en una disolución determinada o un extracto de tejido, puede determinarse cuantitativamente en relación al efecto catalítico que produce. Para este objeto es necesario saber:

1. La estequiometría global de la reacción catalizada.
2. Si la enzima precisa de la adición de cofactores, tales como los iones metálicos o coenzimas.
3. Su dependencia de las concentraciones de sustrato o de los cofactores; es decir el valor de K_m para el sustrato y para el cofactor.
4. Su pH óptimo.
5. Una zona de temperatura en que sea estable y muestre actividad elevada.
6. Un procedimiento analítico sencillo para determinar la desaparición del sustrato o aparición de los productos.

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA INVERTASA DE LEVADURA

La invertasa es una enzima que se clasifica en la clase 3 de las hidrolasas y dentro de éstas se ubica dentro de la subclase 3.2 de las glicosidasas, siendo específicamente una β -fructofuranosidasa. El sustrato principal de esta enzima es la sacarosa (disacárido no reductor) y la reacción que cataliza es la siguiente:



La actividad de la enzima en estudio puede determinarse midiendo la concentración de los productos de hidrólisis (azúcares reductores) mediante el método de Nelson-Somogyi.

OBTENCIÓN DE LA ENZIMA

La invertasa de la levadura se obtiene por lisis celular y suspensión acuosa, quedando la enzima en solución. El extracto centrifugado se utiliza sin más purificación.

En un mortero se disgregan 5 g de levadura, 0,5 g de fosfato diamónico y 1 ml de tolueno, se mezclan bien homogeneizando la pasta perfectamente. Se deja 15 minutos a temperatura ambiente y se agregan, en pequeñas porciones, 90 ml de agua destilada a 35 °C, procurando deshacer y suspender bien todo el material con el pilón. Dejar luego en reposo durante 15 min, con agitación ocasional. Centrifugar a 3000 r.p.m. durante 15 min. Decantar cuidadosamente el sobrenadante que contiene el extracto enzimático.

¿Cómo detener la reacción enzimática? - Desproteínizado

La actividad de la enzima en estudio puede determinarse midiendo la concentración de los productos de hidrólisis. Para ello, se preparan las mezclas de reacción en determinadas condiciones, y se detiene la acción de la enzima a ciertos tiempos, utilizando reactivos de distinta naturaleza.

En este caso la detención de la reacción enzimática se logra por desproteínización con el agregado de NaOH y Zn SO₄ formando Zn(OH)₂ que precipita y arrastra a la enzima. El precipitado o flóculo blanco se filtra y sobre una alícuota del filtrado se realiza la reacción de color de Nelson-Somogyi.

A) DEPENDENCIA DE LA VELOCIDAD DE REACCION ENZIMÁTICA CON LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO

Determinación de la constante de Michaelis - Menten (Km)

Para obtener Km se miden las velocidades de reacción con *cantidades constantes de enzima y concentraciones crecientes de sustrato*, en un medio buffer acético - acetato de sodio a pH 4.77.

Reactivos:

- Buffer acético - acetato pH 4.77
- Sacarosa 0.5 M
- Sacarosa 0.05 M
- NaOH 0.6 N

- Zn SO₄ 0.6 N
- Reactivo Cuprotartárico
- Reactivo Arsenomolibdico
- Extracto enzimático

TÉCNICA: Ordenar en gradillas las siguientes series de tubos:

Tubos de reacción	1	2	3	(Bco)
Tubos de desproteinizado	D-1	D-2	D-3	D-4
Tubos de filtrado	F-1	F-2	F-3	F-4
Tubos de colorimetría	C-1	C-2	C-3	C-4

El extracto enzimático a usar debe ser diluido 1/30.

Se aconseja trabajar en el orden que se indica a continuación:

a) Colocar en los **tubos de reacción** los siguientes reactivos:

Tubos de reacción	1	2	3
Buffer 0.1 M, pH 4.77 (ml)	2.0	2.0	2.0
Sacarosa 0.5 M (ml)	-	-	2.0
Sacarosa 0.05 M (ml)	2.0	4.0	-
H ₂ O d. (ml)	5.0	3.0	5.0
<i>Mezclar y dejar a temperatura ambiente</i>			
Adicionar a c/tubo con pipeta distinta. Dejando la pipeta en el tubo correspondiente:			
Enzima (1/30) (ml)	1,0	1,0	1,0
Mezclar			
Limpiar la pipeta con la mezcla reactiva succionando y liberando el contenido			
Comenzar a contar el tiempo de 10 minutos			
En el tiempo de espera iniciar el protocolo de desproteinizado.			

b) Colocar en los **tubos de desproteinizado** los siguientes reactivos:

Tubos desproteinizado	D-1	D-2	D-3	D-4(Blanco)
Na(OH) 0.6 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0
Al cabo del tiempo de reacción (10'), extraer 1 ml de mezcla de reacción (con su correspondiente pipeta) y dejarlo caer cerca del fondo de los tubos de desproteinizado correspondientes, como se indica a continuación:				
Mezcla reactiva (ml)	1,0	1,0	1,0	No contiene
Zn SO ₄ 0,6 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0
H ₂ O d (ml)	7,0	7,0	7,0	8,0
Filtrar				
Recibiendo en los tubos de filtrado (F), cuyo subíndice debe corresponder al número de tubo del que proviene la mezcla				
Tubos de Filtrado	F-1	F-2	F-3	F-4
Tomar 0,5 ml de cada filtrado				
Trasvasar a los tubos de colorimetría correspondientes, para efectuar la reacción de color				
Tubos de colorimetría	C-1	C-2	C-3	C-4
Filtrado (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5
Rvo.Cuprotartárico	0,75	0,75	0,75	0,75
Mezclar suavemente				
Colocar en baño maría hirviendo durante 10 min.				
Enfriar con agua corriente y agregar en ml:				
Rvo. Arsenomolibdico	0,75	0,75	0,75	0,75
H ₂ O d.	3,0	3,0	3,0	3,0
Usando guantes de látex invertir los tubos tapándolos con el pulgar				
Eliminar las burbujas cuidadosamente				
Leer Absorbancia en espectrofotómetro a 620 nm				
Utilizar como blanco el tubo N° 4				

Resultados: Con los resultados obtenidos completar los siguientes datos:

Absorbancia del Blanco (Tubo C4):

Tubo N°	C-1	C-2	C-3
Tiempo en minutos	10	10	10
Absorbancia corregida (A del tubo C – A del Bco)			
µmoles de sacarosa hidrolizada (s h)			
Velocidad inicial (s h /ml)/ min			
[S] Concentración de sustrato	0.01 M	0.02 M	0.1 M

Formas gráficas para determinar Km:

1. **Graficar** los valores de “V” en función de [S], aplicando la ecuación de Michaelis-Menten.
2. Utilizando los valores recíprocos $1/V$ y $1/[S]$, **trazar una recta** según la ecuación de Lineweaver-Burk.
3. Determinar el **valor de Km** en la recta anterior.

B) DEPENDENCIA DE LA VELOCIDAD DE REACCIÓN CON EL pH

La actividad de la invertasa, como la de todas las enzimas, depende de la composición iónica del medio y muy especialmente del pH.

Se estudiará la variación de esa actividad en medios de diferente pH.

Reactivos:

- Buffer citrato pH = 3.0
- Buffer citrato pH = 4.5
- Buffer citrato pH = 6.0
- Citrato trisódico 0.1 M pH = 8.6
- Sacarosa 0.5 M
- NaOH 0.6 N
- Zn SO₄ 0.6 N
- Reactivo Cuprotartárico

- Reactivo Arsenomolibdico
- Extracto enzimático

TÉCNICA: Ordenar en gradillas diferentes las siguientes series de tubos:

Tubos de reacción	1	2	3	4	
Tubos de desproteinizado	D-1	D-2	D-3	D-4	D-5 (Bco)
Tubos de filtrado	F-1	F-2	F-3	F-4	F-5
Tubos de colorimetría	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5

El extracto enzimático debe ser diluido 1/30.

Se aconseja trabajar en el orden que se indica a continuación:

a) Colocar en los tubos de reacción los siguientes reactivos:

Tubo N°	1	2	3	4
pH aproximado	3,0	4,5	6,0	8,6
Buffer citrato (ml)	5,0	5,0	5,0	-
Citrato trisódico (ml)	-	-	-	5,0
Sacarosa 0.5 M (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0
H ₂ O d. (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0
<i>Mezclar y dejar a temperatura ambiente</i>				
Adicionar a c/tubo con pipeta distinta. Dejando la pipeta en el tubo correspondiente:				
Enzima (1/30) (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0
Mezclar				
Limpiar la pipeta con la mezcla reactiva succionando y liberando el contenido				
Comenzar a contar el tiempo de 10 minutos				
Iniciar el protocolo de desproteinizado, en el tiempo de espera				

b) Colocar en los tubos de desproteinizado los siguientes reactivos:

Tubos de desproteinizado	D-1	D-2	D-3	D-4	D-5 (Bco)
Na(OH) 0.6 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Al cabo del tiempo de reacción (10 min), extraer 1 ml de mezcla de reacción (con su correspondiente pipeta) y dejarlo caer cerca del fondo de los tubos de desproteinizado respectivos, como se indica a continuación:					
Mezcla reactiva (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	-
Zn SO ₄ 0,6 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
H ₂ O d (ml)	7,0	7,0	7,0	7,0	8,0
Filtrar a través de papel de filtro, con un embudo para cada tubo Recibir el filtrado en los tubos F, cuyo número debe corresponder con el del tubo de reacción del que proviene					
Tubos de Filtrado	F-1	F-2	F-3	F-4	F-5
Tomar 0,5 ml de cada filtrado Trasvasar a los tubos de colorimetría correspondientes, para efectuar la reacción de color de Nelson-Somogyi					
Tubos de colorimetría	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
Filtrado (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Rvo. Cuprotartárico	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Mezclar suavemente Colocar en baño maría hirviente durante 10 min. Enfriar con agua corriente y agregar en ml:					
Rvo. Arsenomolibdico	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
H ₂ O d.	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Usando guantes de látex invertir los tubos tapándolos con el pulgar Eliminar las burbujas cuidadosamente Leer Absorbancia en espectrofotómetro a 620 nm Utilizar como blanco el tubo N° 5.					

Resultados: con los resultados obtenidos completar los siguientes datos:

Absorbancia del Blanco (Tubo C5):

Tubo N°	C-1	C-2	C-3	C-4
pH del medio	3,0	4,5	6,0	7,0
Absorbancia corregida				
µmoles de sacarosa hidrolizada (s h)				
Velocidad inicial (s h /ml)/ min				

1. **Graficar** velocidad inicial de reacción en función del pH.
2. Determinar el **pH óptimo** de la enzima.

CONTENIDOS CLAVES A SER EVALUADOS

ENZIMAS

Actividad de la Invertasa de levadura – Influencia de distintas variables sobre la velocidad de reacción enzimática

Introducción de la Guía de T.P de Aula. Definiciones de Actividad enzimática, Actividad específica, Indice de Cambio.

Fundamentos de las técnicas empleadas en el T. P. de Laboratorio:

- Obtención de la enzima.
- Método colorimétrico de Nelson-Somogyi, fundamento.
- Aplicación de la Curva de Calibración de Glucosa realizada en el T.P. N° 1.

A) Influencia de la **concentración de sustrato** en la Actividad enzimática: Determinación de la constante de Michaelis-Menten (K_m). Importancia y significado de la K_m . Diferentes representaciones gráficas para la determinación de K_m .

B) Influencia del pH en la actividad enzimática, pH óptimo.

T.P. DE LABORATORIO N° 3

TRANSPORTE ELECTRÓNICO MITOCONDRIAL FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

OBJETIVOS

- Describir el transporte de electrones a través de aceptores que experimentan cambios reversibles en su estado redox.
- Comprender y explicar los mecanismos de transformación de energía redox en energía química en forma de ATP: fosforilación oxidativa.
- Diferenciar la acción de inhibidores y desacoplantes sobre el transporte electrónico.
- Demostrar experimentalmente el transporte electrónico mitocondrial en una muestra de tejido animal.
- Comprobar empíricamente la inhibición competitiva de la enzima *succinato deshidrogenasa*.

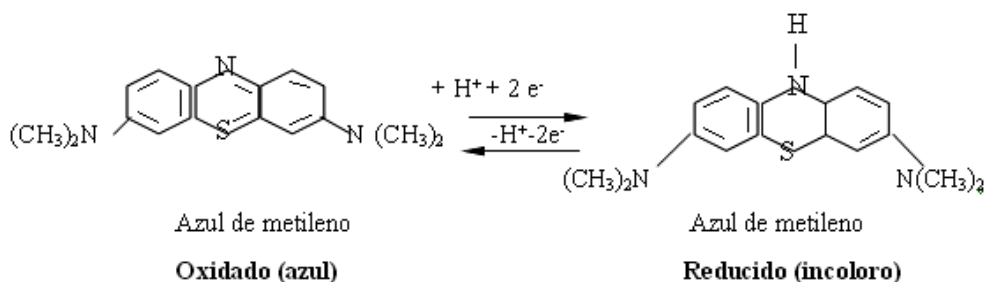
INTRODUCCIÓN

En este trabajo de laboratorio se estudiará el funcionamiento de la cadena respiratoria, utilizando succinato como sustrato y azul de metileno como indicador.

También en esta experiencia se verificará el efecto inhibitorio del malonato sobre la cadena respiratoria.

Existen algunas sustancias orgánicas no fisiológicas como el azul de metileno, que pueden intercalarse en la secuencia de reacciones de la cadena respiratoria, aceptando los electrones provenientes de la oxidación del sustrato. Estas sustancias son de enorme utilidad para estudiar la organización de la cadena respiratoria.

El azul de metileno es una sustancia auto-oxidante, es decir, puede ser oxidada directamente por el oxígeno molecular adquiriendo un color azul intenso. Al reducirse por captación de hidrógeno, el azul de metileno se decolora.



Aprovechando esta característica del azul de metileno, cuyo potencial de óxido reducción es + 0.01, puede estudiarse la oxidación del ácido succínico a fumárico (potencial redox = - 0.030), reemplazando como aceptor de electrones a la coenzima Q por el azul de metileno.

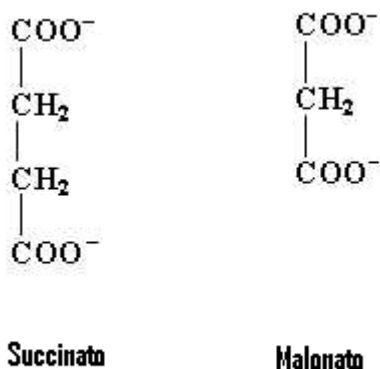
La velocidad de decoloración del azul de metileno proporciona una indicación de la actividad de la succínico deshidrogenasa (que utiliza FAD como grupo prostético) que cataliza la reacción.

La acción de inhibidores sobre esta enzima puede estudiarse comparando el tiempo de decoloración del azul de metileno con el tiempo de decoloración normal, en ausencia del inhibidor.

Preparación del extracto enzimático:

Se utiliza corazón fresco de vaca, el que se corta en trozos pequeños, se pesan 16 gr y se homogeneizan junto con 40 ml de buffer fosfato pH 7.4 en una licuadora fría. Este preparado se centrifuga durante 10 min a 4000 r.p.m. El sobrenadante contiene entre otras, las enzimas de la cadena de transporte electrónico.

En este trabajo práctico, se demostrará el transporte electrónico mitocondrial a través de la captación de hidrógenos por el azul de metileno y se realizará la inhibición competitiva de la *succinato deshidrogenasa* por malonato, cuya estructura molecular es muy semejante a la del sustrato de la enzima.



Reactivos:

Succinato de sodio 0.1 M	Azul de metileno 0.001 M (diluido 1/100)
Buffer fosfato pH 7.4	Extracto enzimático
Malonato de sodio 0.05 M	Vaselina líquida

Técnica:

Agregar a cada tubo las soluciones (en ml) que se indican en el esquema siguiente:

Tubos N°	1	2	3	4	5
Succinato de sodio	0.9	-	0.9	0.9	0.9

Buffer pH 7.4	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Malonato de sodio	-	-	0.2	-	-
H ₂ O destilada	2.1	2.0	0.9	1.1	1.1
Azul de metileno	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
<i>Antes de agregar la enzima leer las siguientes instrucciones</i>					
Succinato deshidrogenasa (sobrenadante)	-	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Mezclar los tubos por inversión</i>					
Vaselina líquida	1.0	1.0	1.0	1.0	-
Tapón de goma	X	X	X	X	-
Hora (al agregar Enzima)					
Tiempo de decoloración					
Justificación de resultados					

RESULTADOS

- Tomar nota del tiempo que demora en decolorarse el azul de metileno en cada uno de los tubos.
- Fundamentar los resultados obtenidos.
- Al decolorarse el Tubo N° 5, agítelo, observe y explique.
- Transcurridos 10 a 15 min., si el tubo N° 3 no decolora agregarle 0.9 ml de succinato de sodio. Observar y justificar el resultado.

CONTENIDOS CLAVE A SER EVALUADOS

TRANSPORTE ELECTRÓNICO

Evidencias del Transporte Electrónico Mitocondrial en animales superiores

Clases de enzimas transferidoras de electrones. Localización celular de las mismas en las células eucariotas.

Secuencia de los transportadores de electrones.

Fosforilación oxidativa: hipótesis quimiosmótica. Relación P/O para sustratos oxidados por deshidrogenasas NAD y FAD dependientes.

Inhibidores del transporte electrónico y desacoplantes de la fosforilación oxidativa: acción y ejemplos.

Fundamentos de la técnica del T.P. de Laboratorio (Introducción en la guía de T.P.

T.P. DE LABORATORIO N° 4

EVIDENCIA DEL TRANSPORTE ELECTRÓNICO FOTOINDUCIDO EN CLOROPLASTOS

OBJETIVOS

- Comprender las reacciones redox del transporte de electrones fotosintético utilizando un aceptor artificial de electrones.
- Demostrar experimentalmente el transporte electrónico fotoinducido, en una muestra de tejido vegetal bajo distintas condiciones.
- Comprobar empíricamente la acción de inhibidores del transporte electrónico cloroplástico.
- Comparar la fosforilación oxidativa mitocondrial con la foto-fosforilación cloroplástica.

INTRODUCCIÓN

Los cloroplastos de las plantas superiores catalizan el transporte de electrones dependiente de la luz desde el agua hasta un aceptor, el NADP^+ . Acoplado a este proceso de óxido reducción se produce la fosforilación del ADP. Estos productos, el ATP y el NADPH_2 representan el “poder asimilador” requerido para reducir el CO_2 a hidrato de carbono en la fase oscura.

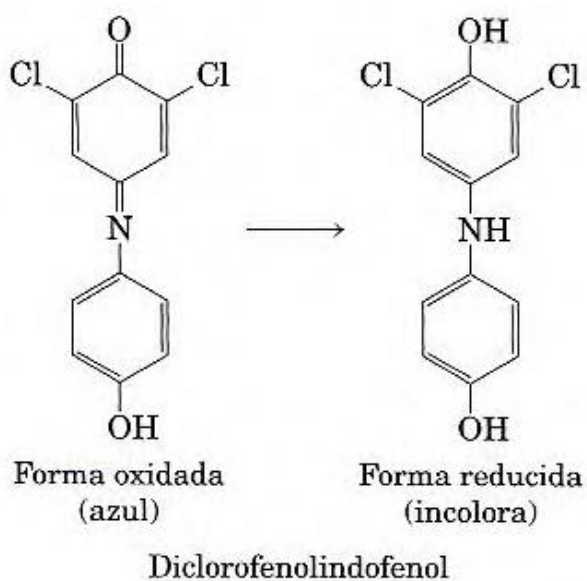
Los componentes de la cadena de transporte electrónico fotosintético están ubicados asimétricamente en la membrana tilacoide del cloroplasto. Cada fotosistema (PS) reduce con luz a su aceptor primario y oxida a su dador primario.

El PS_{II} toma electrones del agua, la que se oxida a O_2 en el proceso llamado “fotólisis del agua”.

El PS_{II} y PS_{I} están conectados en serie por una cadena transportadora de electrones constituida por la plastoquinona, el complejo de citocromo b6-f y plastocianina.

El PS_{I} cede sus electrones a la ferredoxina, la que se oxida por la ferredoxina NADP^+ oxidoreductasa al reducir al NADP^+ . Esta enzima terminal del transporte de electrones fotosintético puede reducir además del NADP^+ distintos aceptores artificiales de electrones como el metilviológico, ferricianuro de potasio y el 2,6-dicloro fenol indofenol (DCPIP). Este último compuesto presenta la ventaja de ser azul cuando está oxidado e incoloro cuando se reduce.

Los objetivos de este trabajo son evidenciar el transporte de electrones cloroplástico bajo distintas condiciones de incubación de un extracto crudo de hojas y comprender las reacciones redox del transporte de electrones fotosintéticos utilizando al DCPIP como aceptor artificial de electrones. Se utilizarán CuCl_2 y el herbicida 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU o Diurón) como inhibidores del transporte electrónico cloroplástico.



- Reactivos:**
- Sacarosa 0.5 M.
 - 2,6-dicloro fenol indofenol (DCPIP) 1mM
 - CuCl_2 30 mM
 - 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU o Diurón) 60 μM

TÉCNICA

A) Obtención de cloroplastos:

- 1) Lavar y enjuagar con agua destilada hojas de acelgas (*Beta vulgaris L.*) descartando las grandes nervaduras y cortándolas en trozos medianos.
- 2) Moler en un mortero 5g de las hojas con 20 ml de sacarosa 0.5 M (helada). Este paso se realiza sobre baño de hielo.
- 3) Filtrar rápidamente con gasa, sobre baño de hielo, para quitar los grandes restos. Distribuir en tubos eppendorf enfriados.
- 4) Centrifugar los tubos eppendorf con la solución a 2500 rpm durante 10 minutos a 5°C y desechar el sobrenadante (los cloroplastos están en el precipitado).
- 5) Suspender el precipitado con los cloroplastos con 10 ml de sacarosa 0.5 M fría. Agitar cuidadosamente. Coloque los tubos con los cloroplastos en hielo hasta que los use en el siguiente paso.

B) Demostración del transporte electrónico cloroplástico bajo distintas condiciones:

Reactivos /Tubo (ml)	1	2	3	4	5	6	7
Sacarosa 0.5M	2,5	2,2	2,2	2,1	2,1	2,2	2,7
CuCl ₂	---	---	---	---	0,1	---	---
DCMU (Herbicida)	---	---	---	0,1	---	---	---
DCPIP	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	---
Cloroplastos	---	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3 (*)	0,3
Luz	+	(**)	+	+	+	+	+
Iluminar simultáneamente todos los tubos							
Tiempo de decoloración							
Justificación de resultados							

(*) Previamente calentar a baño maría 5 min

(**) Cubrir el TUBO 2 con papel de aluminio

- ¿Qué ocurre si se retira el papel de aluminio al TUBO 2 después de 15 min?
- Sacar conclusiones.

CONTENIDOS CLAVE A SER EVALUADOS

FOTOSÍNTESIS

Evidencias del Transporte Electrónico fotoinducido en vegetales superiores

Localización del proceso en la célula vegetal. Reacciones luminosas. Dadores de hidrógeno. Pigmentos fotosintéticos, fotosistemas. Flujo electrónico cíclico y no cíclico. Fosforilación fotosintética; comparación con fosforilación oxidativa. Formación fotosintética de hexosas: Ciclo de Calvin, aceptores de CO₂, principales intermediarios y productos.

Fundamento del T.P. de Laboratorio-Reacción de Hill. Demostración experimental. Acción de herbicidas.

T.P. DE LABORATORIO N° 5
METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO:
EFFECTO PASTEUR- DEMOSTRACIÓN DE LA FERMENTACIÓN ANAERÓBICA EN
LEVADURAS

OBJETIVOS

- Analizar la fermentación anaeróbica en levaduras.
- Demostrar el efecto Pasteur utilizando técnicas de uso frecuente en el laboratorio.

INTRODUCCIÓN

Las células animales, los microorganismos y las plantas utilizan como principal fuente de energía los hidratos de carbono. A partir de su degradación obtienen energía en forma de ATP y otros compuestos de alto contenido energético los cuales son utilizados en los procesos de biosíntesis.

Los intermediarios metabólicos obtenidos de la degradación de la glucosa dependen de las condiciones ambientales en que se encuentran las células. Si la concentración de oxígeno es suficiente, los hidratos de carbono se degradan totalmente hasta CO_2 y H_2O . Por el contrario, cuando la concentración de oxígeno es escasa las células recurren a la fermentación, obteniéndose diferentes tipos de intermediarios metabólicos según el tipo de células y de los sustratos disponibles. Por ejemplo una célula muscular y ciertos tipos de lactobacilos acumulan ácido láctico mediante un proceso conocido como fermentación láctica, en tanto que ciertas levaduras producen alcohol mediante fermentación alcohólica.

Degradación de glucosa por levadura: *Fermentación alcohólica*

En la fermentación alcohólica el piruvato, obtenido a partir del azúcar mediante la vía glicolítica, es transformado en alcohol etílico y dióxido de carbono a través de dos reacciones consecutivas. Primero ocurre una descarboxilación del piruvato con generación de acetaldehído y luego se produce la deshidrogenación de este producto.



Fermentación alcohólica del piruvato

La reacción catalizada por piruvato descarboxilasa es irreversible en las células. La descarboxilasa precisa de Mg^{2+} y se halla unida íntimamente con la coenzima pirofosfato de tiamina (PPT) cuya función es la de transportar transitoriamente el grupo acetaldehído.

En la industria se aprovecha la capacidad de muchos microorganismos de acumular metabolitos que son de gran utilidad. Por ejemplo, en la fabricación de pan y de vino se utilizan diferentes cepas de la levadura *Saccharomyces cereviceae*.

Efecto Pasteur

El “Efecto Pasteur” es un mecanismo de adaptación de las células, por el cual la velocidad de utilización de glucosa es ajustada a los requerimientos metabólicos de la misma. Su nombre se debe a que fue Luis Pasteur, a mediados del siglo XX, quien descubrió que al cultivar levaduras, el consumo de glucosa disminuye notablemente cuando se pasa de un medio anaeróbico a otro con abundante provisión de oxígeno.

La base bioquímica del efecto Pasteur se encuentra en que el rendimiento de ATP de la glucólisis en condiciones **anaeróbicas** es de 2 ATP por molécula de glucosa, el cual es mucho menor que el de la oxidación completa de glucosa a CO_2 obtenido en condiciones aeróbicas (que corresponden a 36 o 38 ATP por molécula de glucosa). Es decir que en anaerobiosis es necesario consumir glucosa 18 veces más, para obtener el mismo rendimiento de ATP que en condiciones aeróbicas.

El ajuste en las velocidades de consumo de glucosa estaría determinado por las siguientes acciones:

a) el aumento de los niveles de ATP y citrato generados en aerobiosis, disminuyen la actividad de la **fosfofructo quinasa**, principal punto de control de la vía glicolítica;

b) la disminución de la actividad de fosfofructo quinasa provoca acumulación de los metabolitos de etapas anteriores de la vía glicolítica, entre ellos la glucosa-6-fosfato. Esta sustancia es un modulador negativo de la **hexoquinasa** y también inhibe el transporte de glucosa a través de la membrana celular.

Estos ajustes en definitiva, consisten en efectos de retroalimentación que contribuyen a disminuir la actividad glucolítica en presencia de oxígeno.

Demostración del Efecto Pasteur

En el Trabajo Práctico se va a evidenciar el efecto Pasteur comparando el consumo de glucosa entre un cultivo de la levadura *Saccharomyces cereviceae* mantenido en condiciones aeróbicas y otro mantenido en condiciones anaeróbicas.

Reactivos

- Medio de cultivo:
 - Extracto de levadura*¹ 0,01 g
 - Glucosa..... 1,00 g
 - (NH₄)₂SO₄ 0,10 g
 - KH₂PO₄ 0,04 g
 - MgCl₂ 0,04 g;
 - FeSO₄ *² 0,01 g;
 - H₂O dest. c.s.p. 200 ml

pH: 4,5-5,00.

Autoclavar a 1 atmósfera de presión durante 20 min.

*¹ Fuente de Nitrógeno (Aa) y de micronutrientes (vitaminas).

*² Agregar FeSO₄ 5 mg/100 ml sólo después del proceso de autoclavado.

Inocular con 1 ml de una suspensión de levaduras (1g en 10 ml de H₂O) en erlenmeyers de 250ml y 125 ml que contienen 100 ml del medio de cultivo cada uno.

Incubar durante 24 hs, el erlenmeyer de 250 ml en **condiciones aeróbicas**, en un shaker a 200 rpm. Al erlenmeyer de 150 ml agregarle una capa de vaselina para crear **condiciones de anaerobiosis** y dejarlo en reposo durante 24 hs.

Para proceder a la determinación de los metabolitos correspondientes se tomará una alícuota de 5 ml de cultivo de cada uno de los erlenmeyers. Si es necesario se hace una centrifugación previa de las alícuotas para evitar interferencias por sustancias en suspensión.

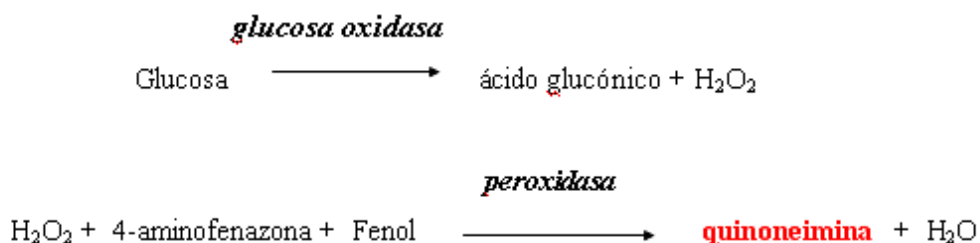
A) Determinación de Glucosa

Se determinaran cuantitativamente los niveles de glucosa en el medio de cultivo al comenzar la experiencia y luego de las 24 hs de cultivo, con el objeto de medir el consumo de la glucosa por las células microbianas.

La determinación se realizará por el método enzimático de la glucosa oxidasa siguiendo las instrucciones del equipo (kit) de marca comercial Wiener.

Fundamento del método

La glucosa es oxidada enzimáticamente por la glucosa oxidasa (GOD) a ácido glucónico, con generación de H_2O_2 . En una segunda reacción catalizada por una peroxidasa (POD), se produce la copulación oxidativa del fenol con la 4-aminofenazona, en presencia de H_2O_2 , dando lugar a la formación de un cromógeno rojo con absorbancia a 505 nm de acuerdo a la siguiente reacción:



La quinoneimina es un compuesto de color rojo que tiene un pico de absorción a 505 nm. La intensidad de color es proporcional a la concentración de glucosa.

Reactivos:

- Estándar: solución de glucosa 1g/l
- GOD/POD: solución de glucosa oxidasa (1000U/l) y peroxidasa (120 U/l)
- Reactivo 4-AF: solución de 4-aminofenazona (25 mmol/l) en buffer Tris 0,92 mol/l.
- Reactivo Fenol: solución de fenol (55 mmol/l).
- Reactivo de Trabajo: adicionar a 1000 ml de agua destilada, 50 partes del reactivo 4-AF, 50 partes de reactivo Fenol. Agregar 3 partes de GOD/POD previamente homogeneizadas. Mezclar por inversión.

TÉCNICA

Preparar 5 tubos de hemólisis rotulados de la siguiente forma:

TUBOS	1	2	3	BLANCO	TESTIGO
Medio de cultivo inicial (μl)	10	---	---	---	---
Cultivo Anaerobio de 24 hs (μl)	---	10	---	---	---
Cultivo aerobio de 24 hs (μl)	---	---	10	---	---
Estándar (μl)	---	---	---	---	10
Rvo. de trabajo (ml)	1	1	1	1	1

Mezclar e incubar 10 min a 37 °C. Leer a 505 nm.

Resultados

Corregir las lecturas restando a la absorbancia de cada tubo, el valor de absorbancia del tubo blanco.

Determinar la concentración de glucosa en cada uno de los tubos de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\boxed{\text{Glucosa g/l: } A_M \times f}$$

$$f = \frac{\text{Concentración del estándar (1,00g/l)}}{A_E}$$

A_M : Absorbancia de la muestra

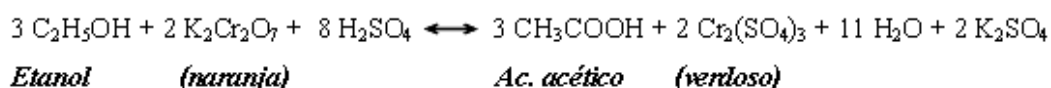
A_E : Absorbancia del estándar

B) - Determinación de Etanol: Método de Microdifusión

La producción de etanol será determinada utilizando el método de microdifusión.

Fundamento del método

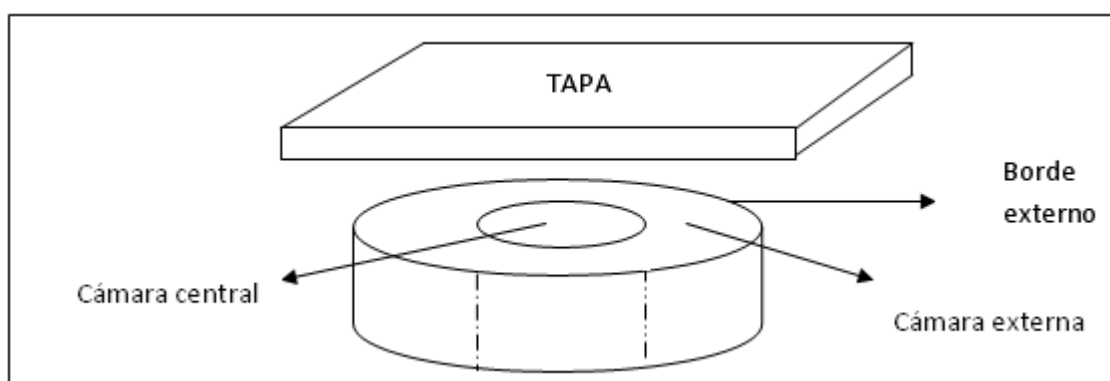
Ciertas sustancias volátiles, como el etanol, son capaces de reaccionar con una solución de dicromato de potasio en ácido sulfúrico, causando la oxidación del alcohol a ácido acético y la reducción del ión dicromato (color naranja) a ión crómico (color azul-verdoso). El cambio de color es indicativo de la reacción positiva.



El etanol es cuantitativamente convertido a ácido acético.



Esta determinación por microdifusión se realiza en una **celda de Conway**, la cual consta de una cámara central y una externa, ambas recubiertas por una tapa común:



Representación esquemática de la celda de Conway.

Reactivos:

- Solución saturada de carbonato de potasio: agregar a 9 ml de H_2O , K_2CO_3 hasta saturación.
- Dicromato de potasio en medio sulfúrico:

$K_2Cr_2O_7$0,9 g

H_2O dest.....34,50 ml

H_2SO_464,6 ml

Llevar a 150 ml con H_2O dest.

- Testigo de etanol absoluto (4 g/l): 0,05 ml de etanol en 10 ml de solución fisiológica (NaCl al 0,9 %).

TÉCNICA

Se realizará la determinación de etanol respetando el siguiente protocolo, utilizando 3 celdas de Conway diferentes:

Celda 1: Cultivo Aeróbico

Celda 2: Cultivo Anaeróbico

Celda Testigo

Colocar los reactivos en las cámaras externa e interna de las respectivas celdas de Conway con sumo cuidado evitando que se mezclen.

Cámara	Reactivos (ml)	Celda 1	Celda 2	Celda testigo
central	Solución sulfúrica $K_2Cr_2O_7$	0,7	0,7	0,7
externa	Solución saturada K_2CO_3	0,5	0,5	0,5
	Muestra (medio de cultivo 24 hs)	2,0	2,0	-
	Solución Testigo, etanol absoluto	-	-	2,0

- Tapar perfectamente cada una de las celdas envaselinando los bordes de las mismas.
- Incubar en estufa a 37°C durante 15 min aprox.
- Observar el cambio de color y justificar los resultados.

CONTENIDOS CLAVES A SER EVALUADOS

METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO: VÍA GLICOLÍTICA

Producción de Etanol en la fermentación de Glucosa por levadura. Consumo de Glucosa en situaciones de aerobiosis y anaerobiosis.

- Vía glicolítica: esquema de todas las reacciones con las enzimas que intervienen.

Función de los grupos fosfato en los intermediarios

Puntos de regulación. Localización celular. Balance energético: producción neta de ATP por degradación de glucosa a piruvato. Consumo de Glucosa en situaciones de aerobiosis y anaerobiosis: “Efecto Pasteur”, importancia, base bioquímica.

- Fermentación alcohólica: degradación de piruvato a etanol, productos, enzimas y cofactores, rendimiento energético. Comparación con la fermentación láctica.

- Introducción de la Guía de T.P.

- Producción de Piruvato, Acetaldehído y Etanol por fermentación de la glucosa en presencia de levadura: formulación de la transformación de piruvato a etanol.

Fundamento de las técnicas de:

- Determinación de etanol por la técnica de microdifusión.
- Determinación de Glucosa por el método de glucosa oxidasa.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL PARA LOS TRABAJOS DE LABORATORIO

- VOET, VOET, PRAT, “Fundamentos de Bioquímica”, Ed. Panamericana, 2da. Ed. (2006).
- BLANCO, A., "Química Biológica", Ed. El Ateneo, 8ª ed. (2007).
- LEHNINGER, A.L., "Principios de Bioquímica", Ed. Omega, 4ª ed. (2007).
- WIENER Lab group, Vademecum 2007.
- FEDUCHI, BLASCO, ROMERO, YÁÑEZ, “Bioquímica conceptos esenciales”. Ed. Panamericana. 1º edición (2010)